



Universidade de Brasília
Faculdade de Ceilândia
Farmácia

MONITORAMENTO E AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE NANOEMULSÕES A BASE DE ÓLEOS NATURAIS

LUCAS CAMPOS DA SILVA

Brasília

2017

LUCAS CAMPOS DA SILVA

**MONITORAMENTO E AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO E
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE NANOEMULSÕES A BASE
DE ÓLEOS NATURAIS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Faculdade de Ceilândia, Universidade de
Brasília, como requisito parcial para obtenção do
título de Farmacêutico.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Graziella Anselmo Joanitti

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Susana Suely Rodrigues Milhomem Paixão

Brasília

2017

LUCAS CAMPOS DA SILVA

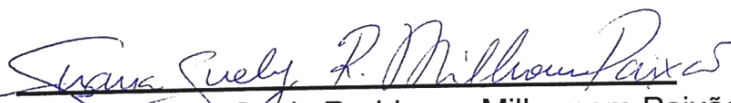
**MONITORAMENTO E AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO E
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE NANOEMULSÕES A BASE
DE ÓLEOS NATURAIS**

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Graziella Anselmo Joanitti

Orientadora



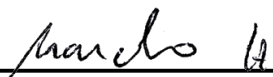
Prof^a. Dr^a. Susana Suely Rodrigues Milhomem Paixão

Co-orientadora



Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira

(Universidade de Brasília / FCE)



Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa

(Universidade de Brasília / FCE)

Brasília

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado oportunidade e toda saúde, paciência, força e dedicação que precisei para a execução e conclusão deste trabalho.

Agradeço minha família, minha mãe Francineide, meu pai Ricardécilo e minha irmã Lívia, por acreditarem no meu potencial e me incentivarem sempre. Amo vocês!

À minha orientadora, Professora Graziella. Meu espelho de pesquisadora. Muito obrigado pelo acolhimento nesses anos, pela paciência e por todos os ensinamentos. Obrigado por sempre me incentivar com suas palavras confiantes e dar todo o apoio que precisei para concluirmos este trabalho.

À minha co-orientadora, Professora Susana S. R. Milhomem Paixão, por todas as contribuições ao trabalho e por me acompanhar nos experimentos quando precisei. Todo seu apoio foi muito importante para mim. Muito obrigado!

Aos “Filhos da Grazi” e todos os amigos do laboratório que me deram toda ajuda que precisei e sempre me aguentaram fazendo muitas perguntas sobre tudo o que via de novo por lá, além das minhas reclamações e brincadeiras de sempre. Em especial, Patrícia, Marina, Henrique, Alicia, Victor Hugo, Victor Mello, Beatriz, Thamara e Marcela.

Aos amigos da faculdade, que me acompanharam por todos esses anos. Em especial, Evelin, Lorena, Patrícia, Ana Flávia, Luana, Érika, Juliana, Bruna, Silvino, Victor Mello, Tales e Gabriel. Obrigado por todos os momentos de apoio, brincadeiras, momentos felizes, frustrações, almoços, tempos livres no chão da faculdade, estudos coletivos, trabalhos em grupo e nossas festas de arropa. Vocês são as melhores pessoas e me orgulho de todos nós. Conseguimos!

Aos professores Diêgo e Marcelo por aceitarem participar da banca examinadora.

Agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram a ter clareza, disposição e paciência para que a conclusão deste trabalho fosse possível.

Muito obrigado!

RESUMO

Os nanocarreadores são materiais nanométricos que podem realizar transporte de múltiplos fármacos e agentes de imagem e biomoléculas. As nanoemulsões são um tipo de nanocarreador, formadas por duas fases imiscíveis, uma aquosa e outra oleosa, estabilizadas por um tensoativo, formando gotículas em escala nanométrica. A utilização desses sistemas na entrega de fármacos elencam vantagens como redução de toxicidade, aumento na atividade farmacológica e da biodisponibilidade. Muitos produtos naturais, como óleos e extratos, estão sendo utilizados nas formulações por conta de seus componentes bioativos. Porém, a avaliação da oxidação lipídica em nanoemulsões é de grande importância, tendo em vista as alterações causadas nos compostos lipídicos que as compõem. Desse modo, seu processo de armazenamento adequado (luz e temperatura) é fundamental para a sua qualidade. O objetivo deste estudo envolve padronizar um protocolo de detecção e monitoramento da oxidação de nanoemulsões a base de óleo de pequi expostas a diferentes condições de temperatura e exposição à luz e caracterizar suas alterações físico-químicas ao longo do tempo. Além disso, determinar a atividade antioxidante dos óleos de pequi, buriti e açaí em suas formas livres e nanoemulsificadas. As formulações mantidas a temperatura mais altas e/ou expostas à luz foram mais propícias a oxidarem e esses eventos de oxidação são tempo dependente nas demais condições de armazenamento. As temperaturas mais baixas minimizaram as taxas de oxidação e as mantém físico-quimicamente mais estáveis. As nanoemulsões de pequi e buriti preservaram o potencial antioxidante dos óleos e apresentaram maior atividade antioxidante que a formulação de açaí.

Palavras-chave: *Caryocar brasiliense*, *Mauritia flexuosa*, *Euterpe oleracea*, metodologia, DPPH, método FOX.

ABSTRACT

Nanocarriers are nanometer materials that can carry multiple drugs and imaging agents and biomolecules. Nanoemulsions are a type of nanocarrier, formed by two immiscible phases, one aqueous and the other oily, stabilized by a surfactant, forming droplets on a nanoscale scale. The use of these systems in the delivery of drugs lists advantages such as reduction of toxicity, increase in pharmacological activity and bioavailability. Many natural products, such as oils and extracts, are being used in formulations because of their bioactive components. However, the evaluation of lipid oxidation in nanoemulsions is of great importance, considering the changes caused in the lipid compounds that compose them. In this way, its proper storage process (light and temperature) is fundamental to its quality. The objective of this study is to standardize a protocol for detection and monitoring of the oxidation of pequi oil-based nanoemulsions exposed to different temperature and light exposure conditions and to characterize their physicochemical changes over time. In addition, to determine the antioxidant activity of pequi, buriti and açaí oils in their free and nanoemulsified forms. Formulations maintained at higher temperature and/or exposed to light are more propitious to oxidize and such oxidation events are time dependent on the other storage conditions. The lower temperatures minimize oxidation rates and keep them physicochemically more stable. Nanoemulsions preserve the antioxidant potential of oils. The pequi and buriti nanoemulsions presented higher antioxidant activity than the açaí formulation.

Keywords: *Caryocar brasiliense*, *Mauritia flexuosa*, *Euterpe oleracea*, methodology, DPPH, FOX method.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	09
1.1 Nanotecnologia e suas aplicações na medicina	09
1.2 Nanoemulsões	11
1.3 Oxidação lipídica.....	13
1.4 Óleos naturais.....	16
1.4.1 <i>Pequi</i>	16
1.4.2 <i>Buriti</i>	16
1.4.3 <i>Açaí</i>	17
1.5 Atividade antioxidante	17
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVOS	21
3.1 Obejtivos gerais	21
3.2 Obejtivos específicos	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Padronização da metodologia de determinação de oxidação lipídica.....	22
4.2 Material	22
4.3 Desenvolvimento das nanoemulsões.....	22
4.4 Monitoramento da oxidação de nanoemulsões a base de óleo de pequi.....	23
4.5 Determinações do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (Pdl) e carga superficial das nanoemulsões	25
4.6 Teste de DPPH	25
4.7 Análises estatísticas.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1 Monitoramento da oxidação lipídica de nanoemulsões a base de óleo de pequi	27
5.1.1 <i>Padronização da metodologia e determinação de oxidação lipídica</i> ...	27
5.1.2 <i>Curva padrão de Ferro³⁺</i>	28
5.2.3 <i>Monitoramento do processo oxidativo das nanoemulsões ao longo do tempo</i>	28

5.2 Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e carga superficial das nanoemulsões de pequi	30
5.3 Análise da atividade antioxidante.....	33
6. CONCLUSÃO	37
7. REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

1.1 Nanotecnologia e suas aplicações na medicina

A nanotecnologia é uma ciência e tecnologia conduzida e manipulada em escala nanométrica (1 a 100 nanômetros) aplicada em todos os campos da ciência. Suas ideias e conceitos foram inicialmente discutidos a partir da palestra intitulada “*There’s Plenty of Room at the Bottom*” pelo físico Richard Feynman em reunião da Sociedade Americana de Física em 1959. Por se tratar de tecnologia multidisciplinar, que consiste na área da física, química, biologia e medicina, o campo de aplicação da nanotecnologia é vasto, porém os grandes destaques estão na nanoeletrônica, nanobiotecnologia e nanomateriais (CADIOLI & SALLA, 2015).

A nanociência e a nanotecnologia aparecem como uma inovação industrial ao representar uma alternativa para o estudo dos fenômenos e manipulação de materiais na escala atômica e molecular, pois as propriedades são significativamente diferentes daquelas observadas em escalas maiores (ABDI, 2010). Segundo Leary (2010), nanoestruturas são fundamentalmente formas diferentes de matérias e mais que estruturas químicas simples. Diferenciam-se das estruturas convencionais não só pelo tamanho, mas também pela organização e ordem da mecânica quântica. A nanotecnologia está relacionada com materiais e sistemas cujas estruturas e componentes exibem novas propriedades, fenômenos e processos físicos, químicos e biológicos significativamente aprimorados devido ao seu tamanho em nanoescala (CAPPY, STIEVENARD & VUILLAUME, 2002).

O crescente interesse nas aplicações médicas da Nanotecnologia levou ao aparecimento de uma área conhecida como nanomedicina (FIGUEIRAS, COIMBRA & VEIGA, 2014). É uma área de grande destaque e tem promovido várias mudanças na medicina tradicional. A nanomedicina vem desenvolvendo e transformando uma grande variedade de produtos e serviços com potencial de melhorias para a prática clínica e a saúde pública. Dispositivos de diagnóstico *in vitro*, nanobiossensores, imagiologia ótica e liberação controlada de fármacos através de nanocarreadores são algumas das atuais contribuições da nanotecnologia aplicada às ciências biomédicas (FIGUEIRAS, COIMBRA & VEIGA, 2014).

Os nanocarreadores são materiais nanométricos que podem realizar transporte de múltiplos fármacos e agentes de imagem e biomoléculas. Eles possuem uma elevada área de superfície e são utilizados para aumentar a concentração de fármacos em determinado local e promover a liberação sustentada dos mesmos e impedindo a sua degradação (PEER et al., 2007). Dentre os nanocarreadores mais estudados pode-se citar nanopartículas poliméricas, nanocarreadores baseados em lipídeos tais como lipossomas e micelas, nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro (PEER et al., 2007); (FIGUEIRAS, COIMBRA & VEIGA, 2014).

A união da possibilidade de diagnóstico associado com a terapia, a redução de dose mínima para atingir efeito esperado e o direcionamento de medicamentos convencionais para o alvo a ser tratado (diminuindo efeitos adversos) são resultados da nanociência médica (KEY & LEARY, 2014). Muitos tratamentos são desafiadores, pois moléculas situadas dentro de células alvo casualmente não conseguem ser alcançadas. Adicionalmente, também há dificuldade de transposição de barreiras biológicas, como a hematoencefálica. Por trabalhar na escala nanométrica, a nanomedicina apresenta a capacidade de atingir tais moléculas e transpor mais facilmente essas barreiras biológicas (TATAR et al., 2016).

O desenvolvimento de formulações nanotecnológicas objetivando o tratamento do câncer, doenças inflamatórias, cardiovasculares, neurológicas e ao combate da AIDS tem sido o foco da nanociência. Existem muitos estudos clínicos com nanomedicamentos em andamento no tratamento do câncer de pulmão, ovário, hepatocarcinoma e, principalmente relacionados ao câncer de mama (LOLLO et al., 2011); (DIMER et al., 2013).

As aplicações da nanotecnologia na medicina podem criar novas oportunidades de desenvolvimento de técnicas e aparelhos que permitem melhorar a qualidade de vida das populações, gerando muitas possibilidades em torno do seu estudo. Com avanço de seu desenvolvimento, acarretará um papel preponderante nos avanços direcionados a uma medicina personalizada, melhorando a sensibilidade e especificidade de técnicas já existentes, assim como possibilitando o desenvolvimento de novos instrumentos de diagnóstico, culminando em terapias

mais precoces e específicas que poderão melhorar a eficácia dos tratamentos e reduzir os efeitos adversos (FIGUEIRAS, COIMBRA & VEIGA, 2014).

1.2 Nanoemulsões

As nanoemulsões são um tipo de nanopartículas que, assim como as emulsões convencionais, são formadas por duas fases imiscíveis, uma aquosa e outra oleosa, estabilizadas por um tensoativo, formando gotículas em escala nanométrica, geralmente com tamanho entre 20 e 500 nm (Figura 1). A adição de um agente emulsificante é necessária para a criação destas gotículas, uma vez que diminui a tensão interfacial, isto é, a energia superficial por unidade de área, entre as fases de óleo e água da emulsão. Além disso, desempenha um papel estabilizante para as nanoemulsões através de interações eletrostáticas repulsivas (GUPTA et al., 2016). O menor tamanho das gotículas nanométricas previne o sistema dos fenômenos de floculação e coalescência, além de torná-los visualmente transparentes e com baixa viscosidade. Estas características promovem às nanoemulsões um uso crescente em aplicações variadas (SADURNI et al., 2005).

O tamanho e as características de estabilidade de suas gotículas diferenciam as nanoemulsões das micro e macroemulsões. Macroemulsões e nanoemulsões são termodinamicamente instáveis, ao contrário das microemulsões, o que leva à separação de fases depois de um determinado tempo. Porém, as nanoemulsões são cineticamente estáveis e relativamente menos sensíveis a alterações físicas e químicas quando comparadas com as microemulsões (GUPTA et al., 2016).

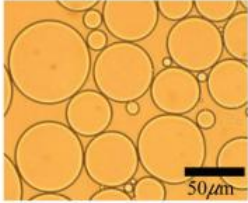
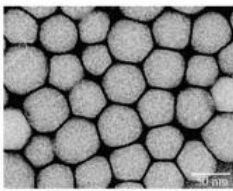
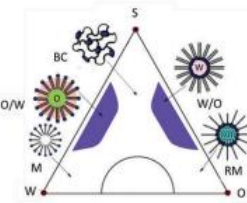
	macroemulsões	nanoemulsões	microemulsões
			
Tamanho	1-100 μm	20-500 nm	10-100 nm
Forma	esférica	esférica	esférica e lamelar
Estabilidade	termodinamicamente instável, levemente cineticamente estável	termodinamicamente instável, cineticamente estável	termodinamicamente estável
Método de preparação	alta e baixa energia	alta e baixa energia	baixa energia
Polidispersão	frequentemente (>40%)	frequentemente (<10-20%)	frequentemente (<10%)

Figura 1. Comparação do tamanho, forma, estabilidade, método de preparação e polidispersão de macroemulsões, nanoemulsões e microemulsões. (Adaptada de GUPTA et al., 2016).

Além de cineticamente estáveis, as nanoemulsões são translúcidas, possuem maior área de superfície em relação ao seu volume e carregam alta energia livre. Logo, são veículos ideais para o transporte parenteral de fármacos, pois possuem capacidade de dissolução de grande quantidade de compostos hidrofóbicos, além de sua capacidade de proteger seu conteúdo de hidrólises e degradações enzimáticas (FIGUEIRAS, COIMBRA & VEIGA, 2014). Desse modo, o uso de nanoemulsões pode ser administrado por diferentes vias, tais como tópica, ocular, oral e intravenosa (SADURNI et al., 2005).

Estudos relatam o potencial da utilização desses sistemas na entrega de fármacos elencando vantagens como redução de toxicidade, aumento na atividade farmacológica, mais segurança na janela terapêutica e aumento da biodisponibilidade (BRUXEL et al., 2012). Nesse sentido, as nanoemulsões são alternativas promissoras no tratamento de doenças como o câncer. Isso é possível devido suas características carreadoras de compostos lipossolúveis, permitindo o nanoencapsulamento de moléculas bioativas, diminuindo seu tamanho, reduzindo sua toxicidade e aumentando sua disponibilidade no organismo (TAGNE et al., 2008).

Segundo a Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005 (BRASIL, 2005), a estabilidade de potenciais produtos farmacêuticos pode ser determinada a partir de fatores que causam alterações em suas estruturas, como temperatura, luz, propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes do próprio produto e outros. A oxidação é um dos fatores que mais pode ocasionar a instabilidade de uma emulsão, independente de sua escala, resultando em alterações do odor e principalmente aparência do produto, podendo ser causada pelo oxigênio atmosférico, principalmente na fase oleosa (ZANON, 2010). Assim, a avaliação da oxidação lipídica em nanoemulsões é de grande importância, tendo em vista as alterações que reações do tipo autooxidação e fotoxidação causam nos compostos lipídicos que as compõem, podendo trazer instabilidades a seus produtos. Desse modo, seu processo de armazenamento adequado, levando em consideração tais modificações ao longo do tempo, é fundamental para a manutenção de sua qualidade (GUIMARÃES et al., 2008).

1.3 Oxidação lipídica

Assim como todo lipídio, a fase oleosa das nanoemulsões pode sofrer oxidações se expostas à luz ou variações muito altas de temperatura. Geralmente, os óleos na presença de oxigênio, luz, calor, umidade e metais são muito instáveis, sofrendo inúmeras reações de degradação, o que dificulta a sua conservação (GUIMARÃES et al., 2008). A oxidação desses lipídios está relacionada com a formação de radicais livres que podem causar alterações indesejáveis e levar a formação de produtos que podem desencadear uma série de eventos bioquímicos conhecidos como oxidação lipídica (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Os radicais livres são espécies químicas que contém elétrons não emparelhados, o que pode aumentar a reatividade de átomos ou moléculas. Desse modo, são bastante instáveis e reativos. Os mesmos podem reagir com outras moléculas, aceitando ou doando elétrons, para se tornarem mais estáveis. A reação entre um radical e um composto não radical conduz geralmente à propagação de uma reação em cadeia e a uma geração crescente de novos radicais livres (REPETTO, BOVERIS & SEMPRINE, 2012). Quando em excesso, os radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (EROs), podem se tornar altamente tóxicos,

pois são muito instáveis e podem interagir com compostos e moléculas do organismo e, desse modo, estar associadas ao desencadeamento de doenças, incluindo câncer, processos inflamatórios e envelhecimento (MURAINA, SULEIMAN & ELOFF, 2009).

Biologicamente falando, a oxidação lipídica, também conhecida como peroxidação lipídica é um processo relacionado com a destruição a partir da oxidação de membranas biológicas e outras estruturas contendo lipídios e proteínas. Como a peroxidação lipídica é um processo em cascata desencadeado por uma série de EROs, resulta em uma abundância de vários produtos. Muitas vezes, estes produtos são altamente instáveis num ambiente biológico e reagem facilmente com proteínas (GRINTZALIS et al., 2012). Nesse processo, as espécies reativas de oxigênio formadas desintegram os ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolípideos das membranas de células normais, liberando a entrada dessas espécies reativas nas estruturas intracelulares, causando danos expressivos em sua estrutura e função (LIMA & ABDALLA, 2001).

Em sua aplicação em alimentos e em outras áreas, uma das principais causas de deteriorização de óleos é a autooxidação. O ranço é o resultado dessa oxidação e é responsável pelas alterações sensoriais dos óleos. Nesse processo, verifica-se a reação do oxigênio atmosférico com as duplas ligações dos ácidos graxos insaturados, produzindo peróxidos e hidroperóxidos que através de outras reações em paralelo, resultam em compostos como aldeídos, cetonas e alcoóis que são responsáveis por características de ranço nos produtos. O ranço também destrói vitaminas, ácidos graxos essenciais e proteínas do meio que está presente. (MELO FILHO & VASCONCELOS, 2016).

A fotooxidação é outro mecanismo causado pela ação da incidência de luz sob o óleo. Apresenta diferenças da autooxidação, como: não apresentar período de indução e o oxigênio age direto nas duplas ligações dos lipídios, sem formar radicais livres, havendo formação imediata de hidroperóxidos (MELO FILHO & VASCONCELOS, 2016).

Para a monitorização da oxidação lipídica, métodos espectrofotométricos, cromatográficos e imunoquímicos podem ser utilizados. A análise em si pode ser baseada na análise dos produtos primários de oxidação lipídica como dienos

conjugados e hidroperóxidos lipídicos, ou produtos secundários, como malondialdeído, alcanos ou isoprostanos (REPETTO, BOVERIS & SEMPRINE, 2012). Os métodos espectrofotométricos para a análise da oxidação lipídica são bem reproduzíveis e de baixo custo. Os hidroperóxidos totais podem ser determinados utilizando a oxidação de íons de ferro no teste com xilenol *orange* (FOX). O princípio do método FOX é baseado na oxidação de íons ferrosos (Fe^{2+}) a férrico (Fe^{3+}) pela atividade de hidroperóxido no ambiente ácido. O mecanismo exato da sequência de reações de radical não é conhecido, mas o mecanismo utilizado por Shanta & Decker (1994) e modificado por Grintzalis et al. (2012) é mostrado nas reações 1-4 (Figura 2).

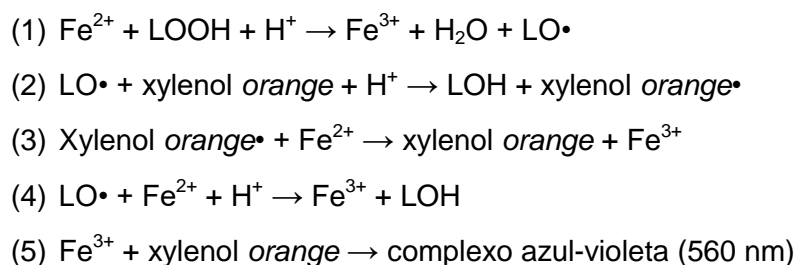


Figura 2. Sequência do mecanismo de reações radicais. (Adaptado de Repetto, Boveris & Semprine, 2012).

O aumento da concentração de íon férrico (Fe^{3+}) é então detectado a partir do xilenol orange (Figura 3), que forma um complexo azul-violeta com íon férrico (Figura 2, reação 5) com um máximo de absorção a 560 nm.

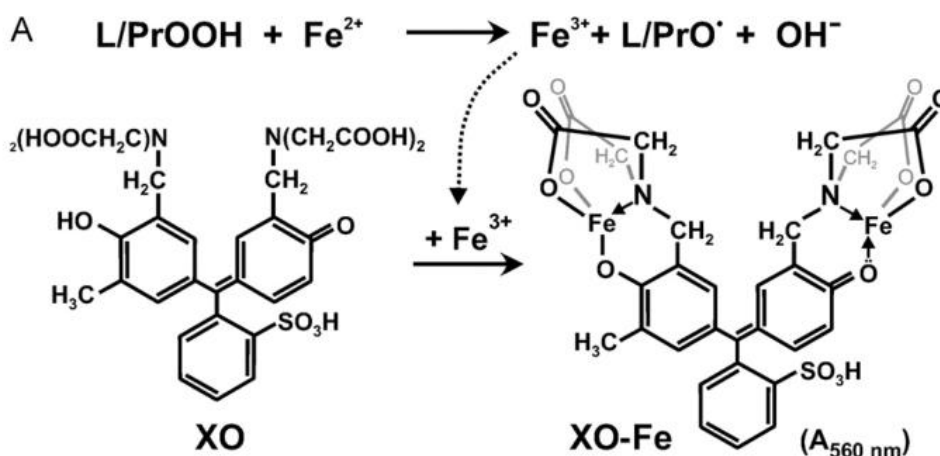


Figura 3. Mecanismos de reação dos ensaios FOX, utilizado para a determinação de produtos de oxidação em lipídios. L/PrOOH: Hidroperóxidos. (GRINTZALIS et al., 2012).

1.4 Óleos naturais

Muitos produtos naturais, como óleos e extratos, estão sendo utilizados como agentes quimioprotetores de combate aos cânceres devido seus componentes bioativos. Dentre essas moléculas, podem-se citar os antioxidantes poderosos, que representam um dos grupos mais estudados até o momento os compostos fenólicos e os grupos reativos que conferem propriedades de citoproteção (REDDY et al., 2003). A biocompatibilidade desses óleos de origem natural torna este sistema uma alternativa promissora para a administração de diversos tipos de moléculas no organismo. (BRUXEL et al., 2012).

1.4.1 Pequi

O pequi (*Caryocar brasiliense*) é um fruto da família Caryocaraceae muito presente no cerrado brasileiro. O seu óleo pode ser extraído tanto da semente como da polpa, sendo muito rico em lipídeos, vitamina A e proteínas. O óleo extraído da semente apresenta atividade antifúngica e possui bioatividade em testes de suscetibilidade *in vitro* sobre isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Paracoccidioides brasiliensis* (ASCARI et al., 2013). Em outros estudos, foi comprovado que o óleo de pequi também possui características anti-inflamatórias, diminuindo a presença de mediadores inflamatórios e a pressão sanguínea após a prática de exercícios físicos (MIRANDA-VILELA et al., 2009). Por ser composto por agentes antioxidantes, como os carotenoides, o óleo de pequi está relacionado com atividade antitumoral e como uma opção de tratamentos antineoplásicos (AZEVEDO-MELEIRO & RODRIGUEZ-AMAYA, 2004; ROESLER et al., 2010); MIRANDA-VILELA et al., 2014). Em testes *in vitro*, o óleo de pequi nanoestruturado apresentou redução significativa da viabilidade de células de carcinoma mamário (ARAUJO, 2016).

1.4.2 Buriti

O buriti (*Mauritia flexuosa*) pertence à família Arecaceae e é comumente encontrado na Amazônia e no Cerrado (GONÇALVES et al., 2006; GILMORE et al.,

2013). O óleo de buriti é amplamente utilizado na medicina popular brasileira. Segundo a população que pratica tal medicina, este óleo possui propriedades vermífugas, analgésicas, antimicrobianas e antiplaquetárias (FUENTES et al., 2013; KOOLEN et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013).

Recentes estudos *in vitro*, em teste de viabilidade celular, células de câncer de mama apresentaram uma significativa citotoxicidade quando em terapia de nanoemulsão de óleo de buriti (SAMPAIO, 2017). Também já foi demonstrado o potencial do óleo na aplicação para trombose (MARTINS et al., 2012) e funções cicatrizantes (BATISTA et al., 2012). Além disso, o buriti é uma rica fonte de compostos antioxidantes como ácido fenólico, flavonoides, tocoferóis, vitamina E e caroteno (AQUINO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

1.4.3 Açaí

O açaí é fruto de uma palmeira pertencente à espécie *Euterpe oleracea* e importante produto para o desenvolvimento agroindustrial da região amazônica (NASCIMENTO et al., 2008). A semente dá origem a um óleo verde escuro, onde estudos realizados constataram que os ácidos graxos mais abundantes no óleo de açaí são o ácido oleico e o ácido palmítico, representando 60 e 20% respectivamente, além de vários outros compostos fenólicos como o ácido vanílico, por exemplo, o que lhe confere propriedades antioxidantes (FAVACHO & OLIVEIRA, 2011). Em outros estudos, associado aos efeitos dos compostos fenólicos e dos flavonóides, foi observado também efeitos preventivos na carcinogênese, como inibição de formação de carcinógenos, aumento no nível de reparo do DNA e imunoregulação (PACHECO-PALENCIA et al., 2008). *In vitro*, o óleo de açaí nanoestruturado apresentou certo potencial citotóxico em ensaio de viabilidade celular nos tempos de 24 e 72 horas de tratamento contra a linhagem de câncer de pele não melanoma humano (A431) (ARAUJO, 2017).

1.5 Atividade antioxidante

Muitos óleos naturais possuem compostos com potencial antioxidante. Muitos desses agentes antioxidantes são utilizados pelo organismo quando necessário para

evitar o estresse oxidativo. Esse evento ocorre como resultado do desequilíbrio entre os sistemas antioxidante e pró-oxidante. É o resultado da intensa geração de EROs, que não são neutralizadas por moléculas antioxidantes endógenas. O conhecimento atual liga muitos tipos de patologias aos danos oxidativos, entre eles, os mais citados são a aterosclerose, diabetes mellitus, distúrbios neurodegenerativos, câncer, doenças reumáticas e doenças autoimunes (REPETTO, BOVERIS & SEMPRINE, 2012).

Para evitar este fenômeno conhecido como estresse oxidativo, o corpo utiliza compostos antioxidantes para inibir os processos de oxidação. Os compostos antioxidantes desempenham um papel importante na prevenção das principais doenças degenerativas, pois são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos (SOARES, 2002).

Os antioxidantes podem ter origem natural, sendo encontrados em compostos de muitas frutas e vegetais (RUFINO, FERNANDES & ALVES, 2009). Vem crescendo o interesse pelos antioxidantes naturais de extratos de plantas devido à sua baixa toxicidade em relação aos outros antioxidantes sintéticos (SOARES et al., 2008). Compostos típicos que possuem atividade antioxidante incluem a classe de fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados, flavonoides, tocoferóis, fosfolipídios, aminoácidos, ácido fítico, ácido ascórbico, pigmentos e esteróis (ROESLER et al., 2007).

Os estudos sobre radicais livres e EROs e o desenvolvimento de métodos para avaliar a atividade antioxidante de compostos orgânicos têm aumentado consideravelmente nos últimos anos (ALVES et al., 2010). Atualmente, o método DPPH é bastante utilizado para determinar a atividade antioxidante em extratos oleosos orgânicos. O DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) é um radical livre estável que apresenta um elétron desemparelhado que se apresenta deslocalizado pela molécula. Além da estabilidade, a deslocalização eletrônica confere a coloração violeta ao composto, cuja absorbância pode ser mensurada nos comprimentos de onda de 515 a 520 nm (MOLYNEUX, 2004). Este ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma substância em sequestrar o DPPH em sua forma radicalar (Figura 4), reduzindo-o a hidrazina. Quando uma determinada substância

que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido (ALVES et al., 2010).

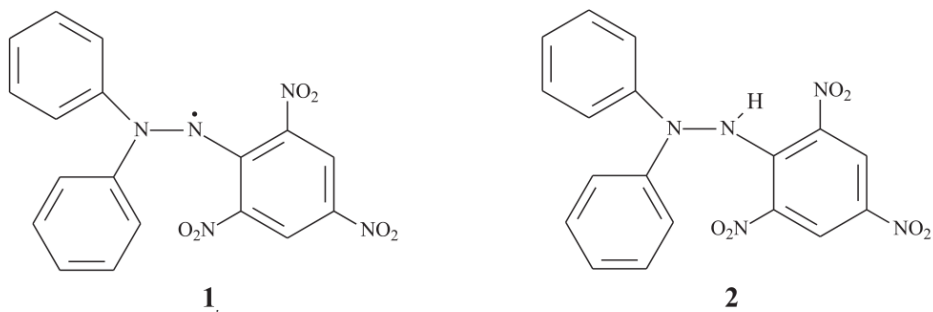


Figura 4. DPPH em forma radicalar (1) e não radicalar (2) (ALVES et al., 2010).

2. JUSTIFICATIVA

A avaliação de produtos destinados às aplicações farmacêuticas, como as nanoemulsões, em diferentes condições de armazenamento é de grande importância, pois quando expostos às variações de temperatura ou luz, por exemplo, podem sofrer alterações importantes que podem determinar a eficácia ou ineficácia das terapias farmacológicas designadas a esses produtos. Muitos trabalhos encontrados sobre nanoemulsões investigam aspectos macroscópicos e parâmetros de tamanho e carga de suas gotículas, são raros os estudos que avaliam o estado de oxidação desse sistema ao longo do tempo. Nesse contexto, é fundamental que a estabilidade de formulações de nanoemulsões seja investigada não apenas no âmbito de aspectos macroscópicos e parâmetros físico-químicos (tamanho e carga), mas também é necessário que se monitore e caracterize o processo oxidativo dessas formulações estocadas em diferentes condições de armazenamento, determinando-se assim a estabilidade das mesmas.

Na busca por novos meios de oferecer compostos antioxidantes ao organismo, as nanoemulsões que são formuladas a base de óleos naturais podem representar bons agentes na redução do estresse oxidativo do organismo, utilizando as propriedades antioxidantes dos compostos presentes no óleo para prevenir ou minimizar os danos oxidativos às células vivas. Além disso, é importante se caracterizar esse potencial antioxidante quando nanoescalados, pois muitos estudos avaliam esses efeitos apenas dos óleos em sua forma livre, sendo escassos os trabalhos que avaliam o efeito antioxidante após suas nanoestruturações.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O objetivo deste estudo envolve padronizar um protocolo de detecção e monitoramento do processo oxidativo de nanoemulsões a base de óleo de pequi expostas a diferentes condições de armazenamento (variações na exposição de luz e de temperatura) ao longo do tempo. Além disso, a partir de metodologia adaptada, determinar a atividade antioxidante dos óleos de pequi, buriti e açaí em suas formas livres e nanoemulsificadas.

3.2 Objetivos específicos

- Padronizar metodologia de avaliação de oxidação de lipídios em nanoemulsões;
- Monitorar e comparar os níveis de oxidação da nanoemulsão de óleo de pequi armazenadas em diferentes temperaturas e exposição à luz ao longo do tempo;
- Monitorar as características físico-químicas (tamanho e carga) da nanoemulsão de pequi armazenada em diferentes temperaturas e exposição à luz ao longo do tempo;
- Determinar a melhor temperatura de armazenamento da nanoemulsão de pequi;
- Determinar e comparar os potenciais antioxidantes dos óleos de pequi, buriti e açaí *in natura* e nanoemulsificados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Padronização da metodologia de determinação de oxidação lipídica

Para a padronização da metodologia de avaliação da oxidação de nanoemulsões a base de óleo de pequi foi realizada uma busca extensiva na literatura científica a fim de se identificar as principais metodologias empregadas para avaliação da oxidação de lipídios em nanoemulsões, como a descrita por Shanta & Decker (1994) e Grintzalis et al. (2012). As metodologias foram revisadas, comparadas e modificadas seguindo critérios como viabilidade de execução, sensibilidade de detecção, custo dos materiais, reagentes utilizados e tempo de experimento para a criação de um protocolo acessível.

4.2 Material

As nanoformulações à base de óleo de pequi, buriti e açaí disponíveis comercialmente, foram elaboradas e fornecidas pelo Laboratório de Nanobiotecnologia (IB/UnB). Todos os experimentos foram realizados com os mesmos lotes de cada óleo. Para ensaios de oxidação lipídica, além da nanoemulsão de pequi, foram utilizados materiais e reagentes como sulfato de ferro (II), cloreto de ferro (III), clorofórmio-metanol (7:3 v/v), metanol (MeOH), tiocianato de amônio e ácido clorídrico 10 N da marca Sigma-Aldrich (EUA) e gás nitrogênio. Para o teste de DPPH, as três nanoformulações foram analisadas a partir dos reagentes: radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila, vitamina C, etanol e metanol.

Toda a infraestrutura e apoio técnico necessário para os experimentos foram disponibilizados pelo Laboratório de Nanobiotecnologia (IB/UnB).

4.3 Desenvolvimento das nanoemulsões

Para a síntese das nanoemulsões foi utilizado o método de sonicação com a presença de tensoativos conforme descrito em Araujo (2016). Para o teste de DPPH foi utilizado o concentrado das nanoemulsões, sendo a primeira etapa do processo de formulação, segundo protocolo da preparação das mesmas.

4.4 Monitoramento da oxidação de nanoemulsões a base de óleo de pequi

Para monitorar o processo oxidativo das nanoemulsões a base de óleo de pequi ao longo do tempo, alíquotas das formulações foram estocadas em diferentes condições de temperatura (4°C, 25°C ou 36°C) e de exposição à luz por um período total de 60 dias. Os brancos (surfactante e água) das formulações também foram monitorados nas mesmas condições de temperatura e exposição de luz. As nanoemulsões tiveram seu grau de oxidação determinado pela metodologia padronizada nos tempos de 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias de formuladas.

A metodologia do protocolo padronizado final foi baseada no método FOX (*ferrous oxidation-xylenol orange*) descrito e modificado por Shanta & Decker (1994) e também modificado por Grintzalis et al. (2012). Baseia-se na detecção de ferro férrico (Fe^{3+}), resultante da oxidação de ferro ferroso (Fe^{2+}) a partir da ação dos produtos da oxidação dos componentes oleosos da nanoemulsão. Essa detecção se dá com uma solução de tiocianato de amônio que, quando em contato com ferro oxidado, apresenta na solução uma cor avermelhada gradual dependendo da quantidade desse ferro. Essa coloração não é observada com o ferro ferroso, permanecendo uma solução incolor. Essas colorações foram medidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm e posteriormente comparados com uma curva padrão de Fe^{3+} junto ao tiocianato de amônio em diferentes concentrações para análise dos resultados.

As soluções de Fe^{2+} e Fe^{3+} foram preparadas pesando 0,05 g de ferro e diluindo em 5 mL de ácido clorídrico 10 N e mais 15 mL de água destilada. A solução de tiocianato de amônio foi preparada diluindo 30 g do reagente em 100 mL de água.

Em eppendorf, pipetou-se 500 μL de cada amostra de nanoemulsão e 500 μL de clorofórmio-metanol e em seguida as soluções foram vortexadas por 3 minutos no escuro. Em seguida, foram centrifugadas a 32870 g a 4°C durante 20 minutos para separação de fases. A fase aquosa superior foi supostamente retirada de cada amostra, que logo depois foram expostas a gás nitrogênio para que secasse todo o clorofórmio e restassem apenas os lipídios nos eppendorfs. Depois, as amostras

foram ressuspensas com 500 µL de metanol. Em outros eppendorfs, passaram-se 470 µL das amostras e adicionaram-se 25 µL de Fe^{2+} e 5 µL de tiocianato de amônio. Os demais controles e brancos foram realizados da seguinte forma (tabela 1):

Tabela 1. Controles e brancos

Reagentes Controles	Amostra (µL)	MeOH (µL)	Fe II (µL)	Tiocianato de amônio (µL)
Amostra + MeOH (500 µL)	470 µL	-	25 µL	5 µL
Branco total	-	500 µL	-	-
Branco amostra + Tiocianato de amônio	470 µL	25 µL	-	5 µL
Branco MeOH + Fe II	-	475 µL	25 µL	-
Branco MeOH + Tiocianato de amônio	-	495 µL	-	5 µL
Branco Fe II + Tiocianato de amônio	-	470 µL	25 µL	5 µL

As amostras foram pipetadas em placa de 96 poços em triplicata com volume de 100 µL e lidas em espectrofotômetro a 450 nm depois de 30 minutos de incubação no escuro.

Para realizar a análise da oxidação nas formulações, foi estabelecida e utilizada a curva padrão de Fe^{3+} apresentada nos resultados. A curva foi realizada pipetando-se 500 µL de metanol em 10 eppendorfs e 500 µL da solução de Fe^{3+} foi adicionado ao primeiro tubo e passado aos outros em uma diluição seriada com fator de diluição de 2. A curva foi realizada a partir dos volumes de Fe^{3+} (1000, 500, 250, 125, 62, 31, 15, 8, 4, 2 e 1 µL) em metanol no total de 1 mL.

O valor de peróxidos, expressos como miliequivalente peróxidos por quilograma de amostra foi calculado segundo a seguinte fórmula apresentada pela metodologia de Shanta & Decker (1994) para o método FOX:

$$\text{Valor de peróxido} = \frac{(A_s - A_b) \times m}{55.84 \times m_0 \times 2}$$

Onde, A_s = absorbância da amostra; A_b = absorbância do controle; m = coeficiente angular da curva padrão de Fe^{3+} ; m_0 = massa em gramas da

nanoemulsão; 55.82 = peso atômico do ferro. A divisão por 2 é necessária para converter a unidade de medida para miliequivalentes de peróxido por kg de amostra.

4.5 Determinação do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (Pdl) e carga superficial das nanoemulsões

O diâmetro hidrodinâmico e a carga superficial das nanoformulações de pequi (armazenadas em diferentes temperaturas e exposição à luz) foram determinados por meio da técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico, utilizando-se o equipamento Zetasizer (Malvern, EUA). Para tal análise realizou-se uma diluição de 100 µL de formulação para 900 µL de água ultrapura (Milli-Q). Foram utilizadas todas as amostras descritas no monitoramento de oxidação em tempos de 1, 7, 15, 30, 45 e 60 dias após a formulação. Para a análise dos resultados, foram consideradas as seguintes características como ideais: PDI (< 0,4), diâmetro hidrodinâmico (< 300 nm) e carga superficial (mais próximo de -30 mV).

4.6 Teste de DPPH

Utilizou-se da metodologia descrita por Rufino et al. (2007) e Roll (2013). Para a execução da metodologia, a solução de DPPH foi preparada dissolvendo 2,36 mg de DPPH e completando o volume para 50 mL em falcon com álcool etílico. A concentração da solução de DPPH diluído em etanol foi de 120 µM.

A partir da solução inicial de DPPH, preparou-se a curva do DPPH variando a concentração de 0 µM a 120 µM, usando etanol como diluente.

Os óleos de pequi, buriti e açaí foram pesados (18 mg), diluídos em etanol (1 mL) e, posteriormente foram diluídos nas concentrações de 9 mg/mL e 4,5 mg/mL. Os concentrados das nanoemulsões, que possuem concentração de 18 mg/mL, também foram diluídos em etanol para obtenção de outras duas concentrações (9 mg/mL e 4,5 mg/mL). A vitamina C foi diluída em metanol nas concentrações de 0,02 mg/mL, 0,010 mg/mL e 0,005 mg/mL. A escolha do etanol para o DPPH e amostras e metanol para vitamina C se deu pela melhor solubilidade dos compostos nos respectivos solventes.

Para a reação, utilizou-se 200 µL da solução de DPPH e 100 µL dos óleos e concentrados das nanoemulsões diluídos em etanol em cada concentração citada previamente. A mistura reagiu durante 20 minutos em local protegido da luz. Foram utilizados como controles: a vitamina C (antioxidante). Após a reação, as absorbâncias da curva de DPPH e das reações (amostras ou controle + DPPH) foram mensuradas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

Os valores de porcentagem de inibição das diluições foram utilizados para calcular o EC₅₀ (concentração mínima para reduzir em 50% o radical DPPH) através de regressão não linear. Todos os dados foram analisados segundo metodologia descrita por Rufino et al. (2007).

4.7 Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados e analisados em triplicatas em três repetições. Os valores foram representados como média ± desvio-padrão. Os testes estatísticos foram feitos pelo software GraphPad Prism 6. O teste usado foi ANOVA e os pós-testes, Dunnett e Tukey. Os valores considerados estatisticamente significativos foram aqueles que apresentaram $P < 0,05$.

5. Resultados e Discussão

5.1 Monitoramento da oxidação lipídica de nanoemulsões a base de óleo de pequi

5.1.1 Padronização da metodologia e determinação de oxidação lipídica

Após a extensiva busca na literatura científica de artigos relacionados ao tema, várias metodologias empregadas para essas avaliações foram analisadas. Alguns métodos, como o descrito por Waraho (2011) não foram utilizados devido inviabilidade de execução da técnica e, outros métodos, como os que utilizam kits comerciais próprios para detecção de oxidação, como o kit "*Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit*" vendido pela empresa Sigma (EUA), não foram utilizados pela dificuldade de acesso ao produto. Porém, as técnicas descritas por Shanta & Decker (1994) e Grintzalis et al. (2012) foram modificadas e adaptadas para a criação de um protocolo de análise de oxidação de nanoemulsões.

Primeiramente, todos os reagentes utilizados foram estudados quanto sua toxicidade, forma correta de manuseio, armazenamento e descarte correto. Em seguida, foram reproduzidos os métodos AOAC, IDF (*International Dairy Federation method*) e FOX descritos por Shanta & Decker (1994) e, após análise de viabilidade dos testes, decidiu-se basear os experimentos no método FOX. Porém, algumas características da metodologia, como reagentes, quantidades e tempos foram alterados segundo a metodologia descrita por Grintzalis et al. (2012). Ao longo dos testes, outros ajustes também foram realizados em decorrências dos equipamentos disponíveis no laboratório.

Algumas alterações relevantes na metodologia durante o processo da padronização podem ser citados, como as alterações de volumes e concentrações dos reagentes devido ao tipo de amostra analisada (nanoemulsão), a alteração do reagente xlenol *orange* pelo tiocianato de amônio, a troca de água pelo metanol para realizar diluições (pois foi observado que a água causava turbidez nas soluções, interferindo nas leituras das absorbâncias). Além disso, a utilização de gás nitrogênio para realizar a secagem das amostras foi feita para agilizar tal processo,

tendo em vista as quantidades de volume das amostras que deveriam ser analisadas.

5.1.2 Curva padrão de Ferro³⁺

A partir da diluição seriada do Fe³⁺ em metanol, obteve-se a curva padrão com resultados de absorbância lidos a 450 nm, apresentados no gráfico a seguir (figura 5). Diferente dos resultados obtidos por Shanta & Decker (1994), a curva padrão se apresentou de forma linear.

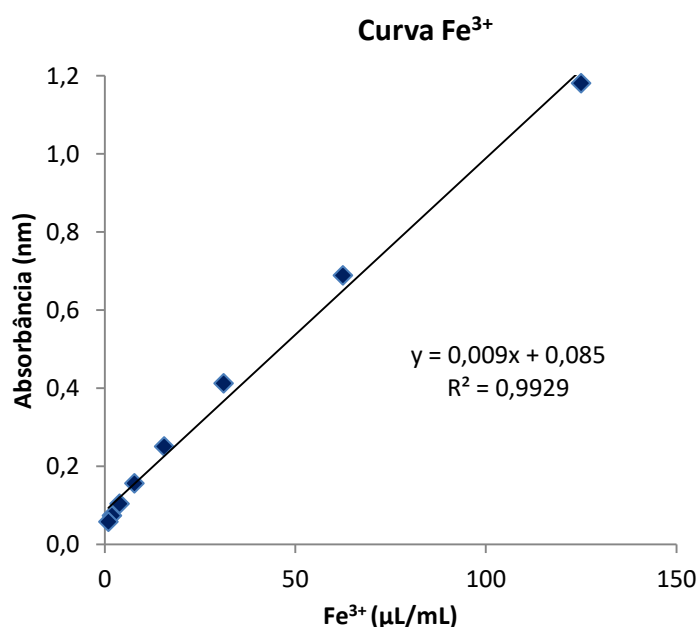


Figura 5. Curva padrão de Ferro³⁺ obtida após interação com tiocianato de amônio.

5.1.3 Monitoramento do processo oxidativo das nanoemulsões ao longo do tempo

Durante 60 dias após formuladas, as nanoemulsões tiveram seu grau de oxidação monitorados segundo a metodologia padronizada. Foram observados graus de oxidação diferentes em relação a temperatura de armazenamento e exposição a luz, como é possível perceber na figura 6 (A). Nota-se que comparando as amostras, destaca-se que a amostra exposta a luz que apresentou um nível de oxidação bem elevado, seguido da amostra a 36°C, que teve uma oxidação

moderada, e a amostra a 4°C que teve um menor grau de oxidação ao longo do tempo. Essa oxidação, em geral, foi mais perceptível após 15 dias de formulação da nanoemulsão, sendo todas tempo dependentes.

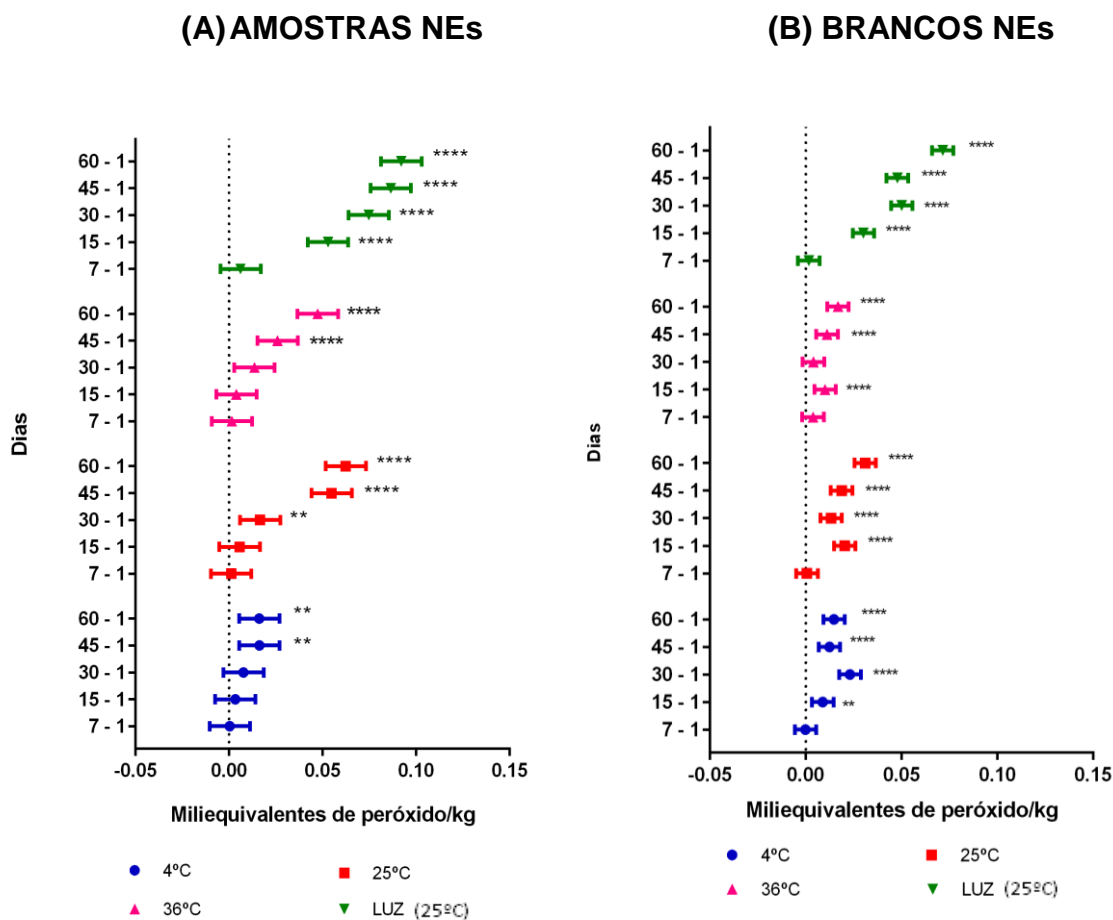


Figura 6. (A) Grau de oxidação das nanoemulsões a base de óleo de pequi armazenadas no escuro com diferentes temperaturas (4, 25 e 36°C) e expostas à luz (25°C). (B) Grau de oxidação dos BRANCOS (formulação sem óleo, apenas água e surfactante) das amostras armazenadas no escuro com diferentes temperaturas e expostas à luz. Os dados representam a média e o desvio padrão ($\bar{X} \pm DP$) das amostras. Os asteriscos representam a diferença estatística de entre amostras da mesma temperatura em relação ao tempo.

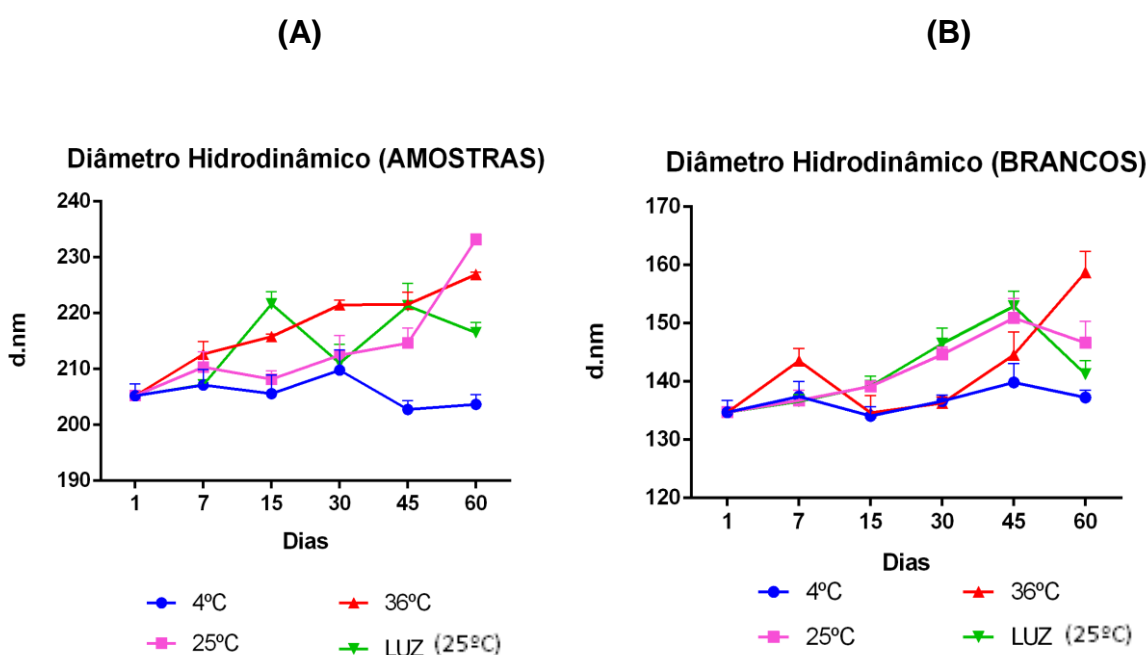
As amostras expostas à luz tiveram seu grau de oxidação bem variado, aumentando em 60 dias aproximadamente 20 vezes mais que o valor inicial. As nanoemulsões armazenadas a 36°C tiveram sua oxidação aumentada em aproximadamente 10 vezes mais comparada ao dia 1. À 25°C, as amostras aumentaram seu nível de oxidação em 15 vezes. As nanoemulsões armazenadas em 4°C ficaram mais estáveis, variando apenas 5 vezes mais que o valor inicial de oxidação após 60 dias de armazenamento.

Comparando as amostras em temperatura ambiente (25°C e exposta ou não à LUZ), observou-se que as amostras expostas à luz tem maior ocorrência de oxidação (figura 6A). Esses resultados corroboram os estudos de Guimarães et al. (2008) que enfatizam que a exposição à luz promove oxidação lipídica.

Como descrito na figura 6 (B), os brancos das amostras, formuladas sem o óleo de pequi, também foram monitorados e percebeu-se que a tendência do grau de oxidação foi parecida com as formulações contendo óleo. Esse fenômeno pode ser causado pelos outros compostos lipídicos presentes na nanoemulsão que podem sofrer processo oxidativo, como o tensoativo, por exemplo.

Shanta & Decker (1994) sugerem alguns problemas e limitações que podem ser advindos do método FOX, sendo eles a instabilidade dos reagentes utilizados na técnica e a alteração de cor advinda do complexo formado pelo ferro II e o marcador de cor, no caso, o tiocianato de amônio, após certo período de tempo da reação. Além disso, são escassos os estudos de oxidação em nanoemulsões, muitos são feitos com óleos livres ou extratos e, desse modo, não é possível obter parâmetros para comparar os resultados encontrados.

5.2 Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e carga superficial da nanoemulsão de pequi



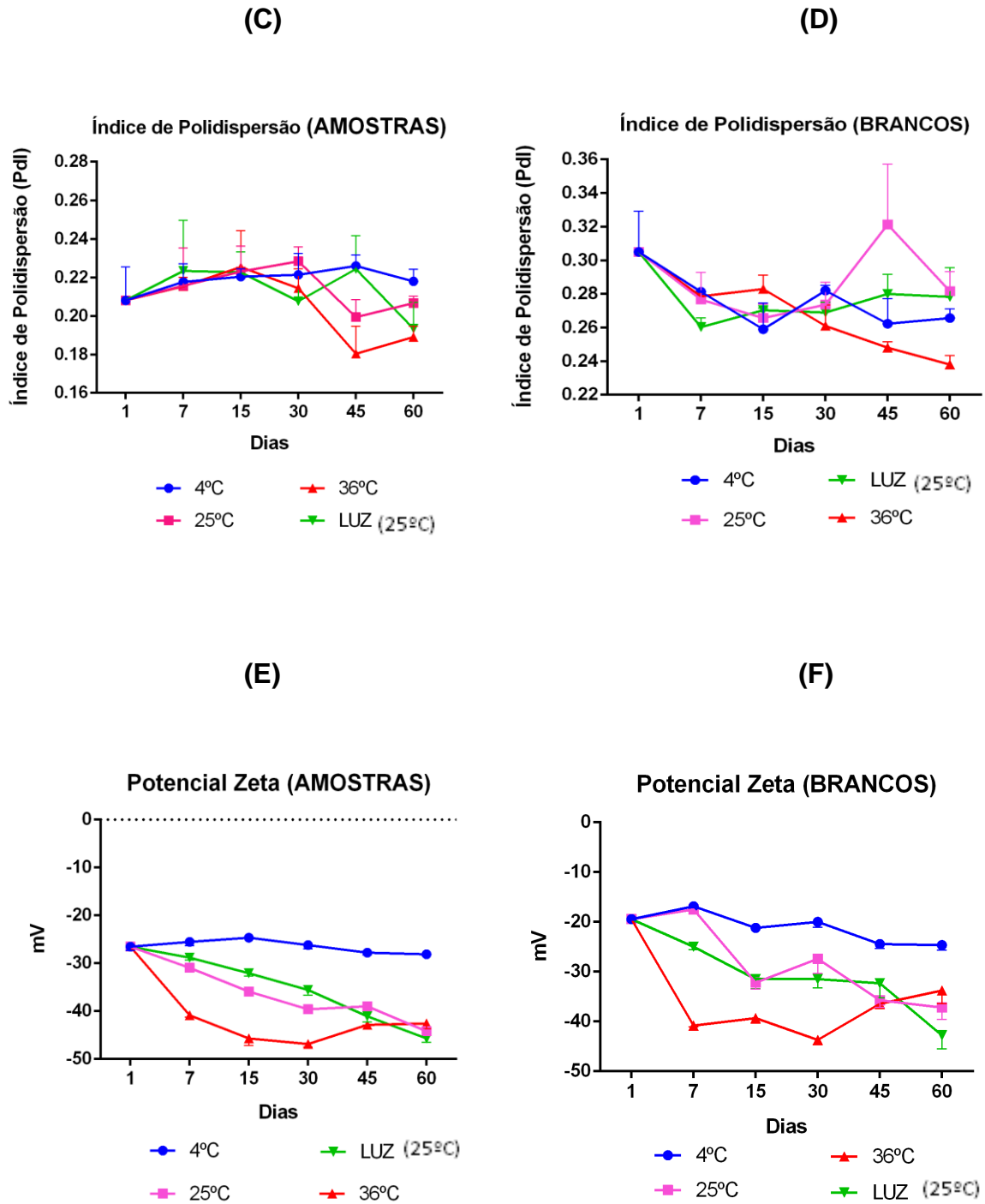


Figura 7. Diâmetro hidrodinâmico (d.nm) das nanoemulsões de pequi (A) e dos BRANCOS (formulação sem óleo, apenas água e surfactante) (B) expostas a diferentes condições de temperatura e luz. Índice de polidispersão das nanoemulsões de pequi (C) e dos BRANCOS (formulação sem óleo, apenas água e surfactante) (D) expostas a diferentes condições de temperatura e luz. Potencial zeta das nanoemulsões de pequi (E) e dos BRANCOS (formulação sem óleo, apenas água e surfactante) (F) expostas a diferentes condições de temperatura e luz. Os dados representam a média e o desvio padrão ($\bar{X} \pm DP$) das amostras.

Os resultados encontrados a partir da análise de tamanho, polidispersão e carga das nanoemulsões são similares às descritas por Marcato et al. (2009). A nanoemulsão armazenada em temperaturas mais baixas apresentou menor variação de diâmetro hidrodinâmico (figura 7A) ao longo dos dias, mantendo seu diâmetro entre 200 e 210 nm, diferente das amostras a 36°C, 25°C e expostas à luz (25°C) que demonstraram maior instabilidade de tamanho, mesmo não sendo uma alteração significativa. Comparando as amostras armazenadas a 4°C e 25°C, os resultados foram similares com os descritos por Araujo (2016), onde a temperatura mais baixa manteve as amostras mais estáveis. Resultados similares foram descritos em estudos feitos com nanoemulsões de buriti e açaí descritos por Sampaio (2017) e Araújo (2017), respectivamente. Então, além da oxidação, o tamanho das nanopartículas pode ser afetado por fatores como a composição da formulação, concentração do surfactante, tipo de lipídio, propriedades do óleo encapsulado, método e condições de produção (tempo, temperatura, pressão, esterilização, etc.). O crescimento das partículas durante a estocagem é um indicativo da instabilidade do material, que pode ocorrer por conta da recristalização do lipídio (MARCATO et al., 2009).

Quanto aos índices de polidispersão das nanoemulsões (figura 7C), também não sofreram tantas variações quando comparadas entre si. É possível perceber que a amostra estocada a 4°C se manteve mais estável quando comparada as amostras exposta à luz e outras temperaturas, sendo esse um fator importante na coalescência da amostra, culminando maior instabilidade para a mesma. Sampaio (2017) e Araújo (2017) também descreveram diferenças nos índices de polidispersão de nanoemulsões de buriti e açaí armazenadas em 4°C e 25°C, sendo a menor temperatura a responsável por maior estabilidade desse parâmetro físico das amostras.

Já no potencial zeta (figura 7E), pode ser observada a diferença de carga entre as NE. As amostras armazenadas a 4°C apresentaram carga menos negativa que as outras e, as nanoemulsões expostas à luz mantiveram cargas próximas às mantidas em escuro em mesma temperatura (25°C). Esses fenômenos podem ser explicados, pois segundo MARCATO et al. (2009), o aumento da temperatura ocasiona o aumento da energia cinética, mudando a cristalinidade das partículas, ocasionando a agregação das mesmas. Essa recristalização pode resultar na

mudança de carga na superfície e, conseqüentemente, alterar o potencial zeta das partículas, podendo ser um indicador de instabilidade (MARCATO et al., 2009).

Todas as amostras e brancos tiveram seu pH medido ao longo do tempo e ambas mantiveram-se estáveis com média de pH 7.

Os brancos analisados (figura 7B, D e F) se tiveram padrão de instabilidade parecido com as formulações testadas. Hipotetiza-se que os compostos da própria nanoemulsão, quando separados do óleo de pequi, também sofram processos oxidativos e contribuam com as modificações físico-químicas das amostras.

É possível correlacionar as ocorrências de estabilidade físico-química com os eventos de oxidação das amostras, pois, as amostras armazenadas a 4°C se mantiveram estáveis durante os 60 dias de análise em ambos ensaios. Logo, é possível que a oxidação seja um fator importante na desorganização do sistema das nanoemulsões tornando-as mais instáveis e vulneráveis a eventos de coalescência e floculação, alterando suas características físico-químicas.

Apesar das amostras expostas à luz ou à 36°C apresentarem graus de oxidação elevados após 15 dias, essa modificação não necessariamente implica em mudanças expressivas nos parâmetros de diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta. Ou seja, a análise de estabilidade de nanopartículas de conteúdo lipídico não deve levar em consideração apenas esses parâmetros físico-químicos, mas devem ser complementadas com a análise de oxidação, a qual fornece informações adicionais sobre a estabilidade destas amostras.

5.3 Análise da atividade antioxidante

O potencial antioxidante dos óleos de pequi, buriti e açaí, junto as suas respectivas nanoemulsões foram avaliados por meio do teste do DPPH. A partir da inibição do radical promovida pelas amostras foram calculados a EC₅₀ (concentração necessária para reduzir 50% do radical DPPH).

Primeiramente, padronizou-se a curva padrão de DPPH nas concentrações de 0 µM a 120 µM.

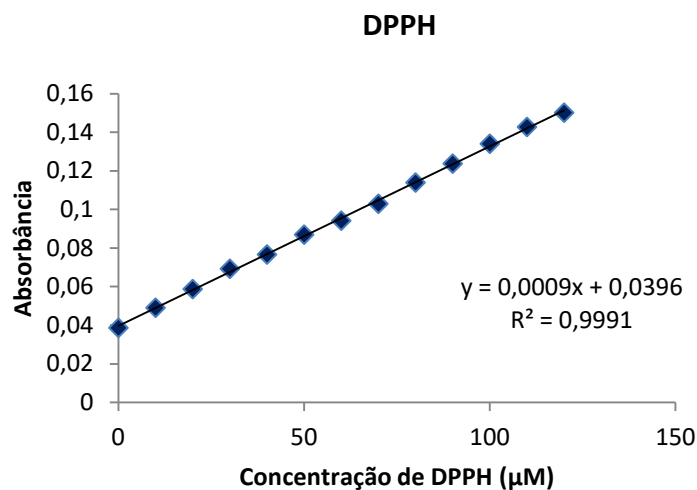


Figura 8. Curva padrão do DPPH.

Os valores de EC_{50} (mg/mL) das amostras, brancos e controles se encontram na tabela 2.

Tabela 2. Capacidade antioxidante de óleos livres (pequi, buriti e açaí) e nanoemulsificados.

AMOSTRAS	EC_{50} (mg/mL)	IC 95%
Vitamina C	0,014	0,011 a 0,0148
Óleo de Pequi	25,04	24,99 a 29,05
Óleo de Buriti	22,68	21,49 a 22,89
Óleo de Açaí	29,84	27,05 a 32,76
NE Pequi	19,5	18,93 a 22,01
NE Buriti	20,3	16,25 a 21,86
NE Açaí	35,5	24,45 a 41,34
Branco das NEs	113,0	85,2 a 119,5

EC_{50} : concentração mínima para reduzir 50% do radical DPPH. IC 95%: intervalo de confiança de 95%. NE: Nanoemulsão. NE Branco: surfactante e água.

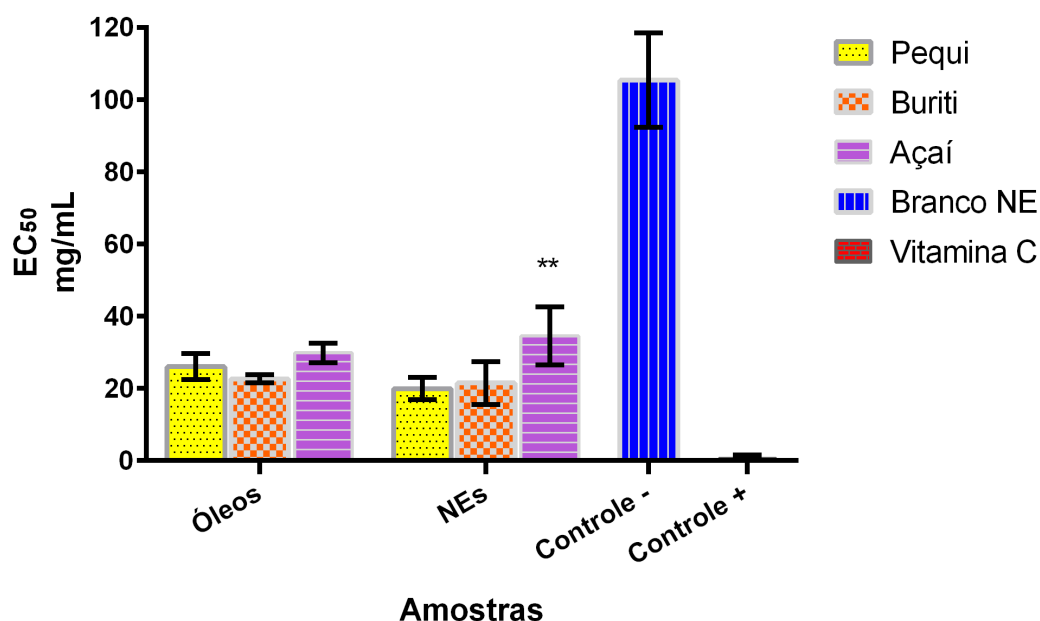


Figura 9. EC_{50} dos grupos óleos livres e nanoemulsões (pequi, buriti e açaí), controle negativo (branco das nanoemulsões: formulação sem óleo, apenas água e surfactante) e controle positivo (vitamina C). Os dados representam a média e o desvio padrão ($\bar{X} \pm DP$) das amostras. Os asteriscos representam a significância entre as amostras do grupo de NEs.

A vitamina C foi utilizada como controle, devido a sua alta capacidade antioxidante já bem conhecida *in vitro*. Segundo a metodologia de Molyneux (2003), quanto menor o valor de EC_{50} das amostras, maior o potencial antioxidante apresentado por elas.

Os óleos livres demonstraram potencial antioxidante quando em contato com o radical DPPH, porém menores que o controle de vitamina C. Assim como demonstrado por Roll (2013), uma concentração média de 25 mg/mL do óleo de Pequi é necessária para reduzir 50% do DPPH. Não houve diferença estatisticamente relevante de potencial antioxidante entre os óleos estudados, porém seus valores podem ser variados. A óleo de buriti apresentou EC_{50} de 22,68 mg/mL e o óleo de açaí 29,84 mg/mL. Segundo Ribeiro (2011), os frutos de diferentes regiões podem apresentar diferenças nos parâmetros físicos e químicos, influenciando assim nos valores do EC_{50} .

As nanoemulsões apresentaram desempenho semelhante na atividade antioxidante quando comparadas com seus óleos livres. A diferença não significativa dessas atividades pode ter acontecido por conta da leitura do espectrofotômetro que

não foi adequada ao método realizado, sendo uma leitura a 550 nm, quando o preconizado é até 517 nm, reduzindo o limiar de análise, não demonstrando tamanha diferença entre os dois grupos de amostras analisados. As formulações de pequi e buriti demonstraram maior potencial antioxidante que a nanoemulsão de açaí. Apresentaram EC_{50} de 19,50 mg/mL, 20,3 mg/mL e 35,5 mg/mL, respectivamente. As nanoemulsões têm como característica maior superfície de contato devido ao menor volume de suas gotículas oleosas, o que pode proporcionar maior eficiência dos componentes antioxidantes dos óleos ao reagir com o radical DPPH.

É preciso ressaltar algumas características do teste que podem influenciar nos resultados. Os carotenoides são os compostos mais comumente encontrados no pequi e são os grandes responsáveis pela atividade antioxidante do fruto (AZEVEDO-MELEIRO & RODRIGUEZ-AMAYA, 2004). Porém, segundo Müller, Fröhlich & Böhm (2011), carotenoides isolados não demonstram potencial de reduzir o DPPH. Desse modo, supõe-se que os óleos podem demonstrar maiores potenciais antioxidantes caso sejam analisados com outras metodologias que possam reagir melhor com os carotenoides, como os métodos FRAP, α TEAC, TRAP e ORAC (MÜLLER, FRÖHLICH & BÖHM, 2011; RUFINO et al., 2007). Desse modo, têm-se a necessidade da realização de experimentos com técnicas mais adequadas e ao longo do tempo para que as alterações dessas atividades sejam monitoradas e melhor compreendidas.

6. CONCLUSÃO

Diante os resultados expostos, uma metodologia de detecção e monitoramento de oxidação em amostras de nanoemulsão foi padronizada e a partir de seus resultados, é possível perceber que as formulações mantidas a temperatura ambiente ou expostas a temperaturas mais altas e/ou expostas à luz estão mais propícias a oxidarem. As temperaturas mais baixas de armazenamento das nanoemulsões de pequi minimizam as taxas de oxidação de sua fase oleosa, podendo contribuir em sua estabilidade química e estrutural. A oxidação aumenta e varia ao longo do tempo, o que leva a um possível tempo limite de estabilidade e segurança de uso dessas nanoemulsões.

A análise de estabilidade de nanopartículas de conteúdo lipídico não deve levar em consideração apenas os parâmetros físico-químicos como diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta, mas devem ser correlacionadas com a análise de oxidação, permitindo indicadores adicionais sobre sua estabilidade. Além disso, as diferentes condições de armazenamento podem contribuir com alterações das características físicas das formulações, principalmente nas temperaturas mais altas e quando há exposição à luz.

Quanto à atividade antioxidante, percebeu-se que os potenciais dos óleos e das nanoemulsões são parecidos, porém as nanoemulsões de pequi e buriti possuem uma atividade um pouco maior que a formulação de açaí. Desse modo, as nanoemulsões preservam estas características dos óleos, sendo importantes ao organismo.

Conclui-se que, para um melhor perfil de estabilidade física e oxidativa, as nanoemulsões de pequi devem ser armazenadas no escuro e em temperatura de 4°C para amenizar o nível de oxidação e manter a formulação estável por mais tempo.

7. REFERÊNCIAS

Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI). Panorama Nanotecnologia. **Série Cadernos da Indústria ABDI – Volume XIX**. Brasília, 2010.

ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

AQUINO, J. S. et al. Refining of buriti oil (*Mauritia flexuosa*) originated from the Brazilian Cerrado: physicochemical, thermal-oxidative and nutritional implications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 2, p. 212-219, 2012.

ARAÚJO, V. H. S. Nanoemulsões à base de óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*): síntese, caracterização e avaliação do efeito em células de carcinoma mamário. Brasília. 2016. 48f. **TCC (Graduação)** - Curso de Farmácia, Universidade de Brasília, Brasília.

ARAÚJO, H. L. L. Efeitos de combinações entre o ácido anacárdico derivado da casca da castanha do caju (*Anacardium occidentale*) e o óleo de açaí (*Euterpe oleracea* mart.), livres ou nanoestruturados, no tratamento de células de câncer de pele não melanoma, in vitro. 2017. **Dissertação de Mestrado** – Universidade de Brasília, Brasília.

ASCARI, J. et al. Aspectos fitoquímicos e biológicos da família Caryocaraceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, p. 293-308, 2013.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, n. 3, p. 385-396, 2004.

BATISTA, J. S. et al. Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. Antibacterial and healing activities of buriti oil *Mauritia flexuosa* L. **Ciência Rural**, v. 42, n. 1, p. 136-141, jan. 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. — **Guia para Realização de Estudos de Estabilidade**.

BRUXEL, Fernanda et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química nova**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 1978-. Vol. 35, n. 9 (2012), p.1827-1840, 2012.

CADIOLI, Luiz Paulo; SALLA, Luzia Dizulina. Nanotecnologia: um estudo sobre seu histórico, definição e principais aplicações desta inovadora tecnologia. **Revista de Ciências Exatas e Tecnologia**, v. 1, n. 1, p. 98-105, 2015.

CAPPY, A.; STIEVENARD, D.; VUILLAUME, D. Nanotechnology: the Next Industrial Revolution?. **Institut d'Electronique et de Microélectronique du Nord**. 2002.

DIMER, Frantiescoli Anversa et al. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química nova**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 1978-. Vol. 36, n. 10, (2013), p. 1520-1526, 2013.

FAVACHO, H.A.S., OLIVEIRA, B.R., et al. "Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Euterpe oleracea* Mart., Arecaceae, oil." **Revista Brasileira de Farmacognosia** 21(1): 105-114, 2011.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, mar. 1997.

FIGUEIRAS, A.R.R.; COIMBRA, A.B; VEIGA, F.J.B. Nanotecnologia na saúde: aplicações e perspectivas. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 2, p. 14-26, abr./jun., 2014.

FUENTES, E. et al. *Mauritia flexuosa* presents in vitro and in vivo antiplatelet and antithrombotic activities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-11, nov. 2013.

GILMORE, M. P.; ENDRESS, B. A.; HORN, C. M. The social-cultural importance of *Mauritia flexuosa* palm swamps (aguajales) and implications for multi-use management in two Maijuna communities of the Peruvian Amazon. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 9, n. 29, p. 1-23, abr. 2013.

GONÇALVES, R. G. et al. Arthropods Associated with the Crown of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) Palm Trees in Three Different Environments from Brazilian Cerrado. **Ecology, Behavior and Bionomics**, v. 35, n. 3, p. 302-312, mai. 2006.

GRINTZALIS K. et al. Method for the simultaneous determination of free/protein malondialdehyde and lipid/protein hydroperoxides. *Free Radic. Biol. Med.* n.59, p.27-35. 2012.

GUIMARÃES, Luiz Gustavo de L. et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf). **Química nova**, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, 2008.

GUPTA, Ankur et al. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft matter**, v. 12, n. 11, p. 2826-2841, 2016.

KEY, J; LEARY, J. F. Nanoparticles for multimodal in vivo imaging in nanomedicine. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 711-726, jan. 2014.

KOOLEN, H. H. F. et al. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 467-473, mai. 2013.

LEARY, J. F. Nanotechnology: what is it and why is small so big?. **Canadian Journal of Ophthalmology**, v. 45, n. 5, p. 449-456, out. 2010.

LIMA, E.S; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Rev. Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, set./dez., 2001.

LOLLO, Giovanna et al. Nanoterapias oncológicas: aplicaciones actuales y perspectivas futuras. In: **Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia**, v. 77, n. 4, 2011.

MANSOORI, G. A. et al. Nanotechnology in cancer prevention, detection and treatment: bright future lies ahead. **World Review of Science, Technology and Sustainable Development**, v. 4, n. 2-3, p. 226-257, 2007.

MARCATO, P. *et al.* Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, p. 1- 37, 2009.

MARTINS, R. C.; TARCISO S. F.; ALBUQUERQUE, U. P. DE. Ethnobotany of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) in a Maroon Community in Central Brazil. **Economic Botany**, v. 66, n. 1, p. 91-98, mar. 2012.

MELO FILHO, Artur Bibiano de; VASCONCELOS, Margarida Angélica da Silva. **Química dos Alimentos**. 2016.

MIRANDA-VILELA, A.L., et al, Oil rich in carotenoids instead of vitamins C and E as a better option to reduce dioxorubicin-induced damage to normal cells of Ehrlich tumor-bearing mice: hematological, toxicological and histopathological evaluations, **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.25, p. 1161-1176, 2014.

MIRANDA-VILELA, A.L., et al, Pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners., **Nutr Res.**, v. 12, p. 850-858, 2009.

MOLYNEUX, Philip. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J. Sci. Technol**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MÜLLER, L.; FRÖHLICH, K.; BÖHM, V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. **Food Chemistry**, v. 129, n. 1, p. 139-148, 2011.

MURAINA, I. A.; SULEIMAN, M. M; ELOFF, J. N. Can MTT be used to quantify the antioxidant activity of plant extracts? **Phytomedicine** **16**. p. 665–668, junho. 2009.

NASCIMENTO, R.J.S. et al. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p.498 -502, 2008.

OLIVEIRA, D. et al. Flavonoids from leaves of *Mauritia flexuosa*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.23, n. 4, p. 614-620, jul. 2013.

PACHECO-PALENCIA, L.A.et al. Absorption and Biological Activity of Phytochemical-Rich Extracts from Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) Pulp and Oil in Vitro. **Agric. Food Chem.** v. 56, p. 3593–3600, 2008.

PEER, Dan et al. Nanocarriers as an emerging platform for câncer therapy. **Nature nanotechnology**, v. 2, n. 12, p. 751-760, 2007.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Natural products for câncer prevention: a global perspective. **Pharmacology & therapeutics**, v. 99, n. 1, p. 1-13, 2003.

REPETTO, Marisa; BOVERIS, Alberto; SEMPRINE, Jimena. Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. **Croatia: INTECH Open Access Publisher**, 2012.

RIBEIRO, D. M. Propriedades físicas, químicas e bioquímicas de pequi (*Caryocar brasiliense* camb.) de diferentes regiões do cerrado. 2011. Departamento de Nutrição Humana. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de Brasília.

ROESLER, R, et al. Brazilian cerrado antioxidant sources: cytotoxicity and phototoxicity in vitro, **Food Science and Technology** (campinas, v.30, p. 814-821, 2010.

ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 27(1): 53-60, jan.-mar. 2007.

ROLL, M. M. Avaliação hematológica e do potencial genotóxico, antigenotóxico e antioxidante do óleo e dos extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso da polpa do pequi (Caryocar brasiliense Camb.) em camundongos Swiss. 2013. **Dissertação de Mestrado** – Universidade de Brasília, Brasília.

RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico**, 2007.

RUFINO, M. S, FERNANDES, F. A, ALVES, R. E. et al. Free radical-scavenging behaviour of some North-east Brazilian fruits in a DPPH system. **Food Chem.** 114(2):693-695. 2009.

SADURNI, N. et al. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 5, p. 438-445, 2005.

SAMPAIO, M. C. Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões à base de óleo de buriti (Mauritia flexuosa) para avaliação de efeitos biológicos em células de câncer de mama in vitro. 2017. **Dissertação de Mestrado** – Universidade de Brasília, Brasília.

SHANTA, N. C.; DECKER, E.A. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. **J. AOAC Int.** v. 77, n. 2, p. 421-424, 1994.

SOARES, M. et al. Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. Ciênc. **Tecnol. Aliment., Campinas** , v. 28, n. 3, p. 727-732, setembro. 2008.

SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos como Antioxidantes. **Revista de Nutrição**, 15(1): 71-81, jan./abr., 2002.

TAGNE, Jean-Bosco et al. A nanoemulsion formulation of tamoxifen increases its efficacy in a breast cancer cell line. **Molecular pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 280-286, 2008.

TATAR, A. et al. Nanomedicine approaches in acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Controlled Release**, v. 238, p. 123-138, set. 2016.

WARAHO, T., MCCLEMENTS, D.J., DECKER, E.A. Impact of free fatty acid concentration and structure on lipid oxidation in oil-in-water emulsions. **Food Chem**, v. 129, n. 3, p. 854-859, 2011.

ZANON, A. B. Aspecto Teórico e prático sobre a avaliação da estabilidade de emulsão manipuladas em farmácia, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2010.